抗人卵泡刺激素受体多克隆抗体的制备及其对实验大鼠骨质疏松的抑制作用*

秦瑞坪，李玲霞，马晓玲，席欧彦，赵婷，邱玲玲，李江伟**

（新疆大学生命科学与技术学院，新疆生物资源基因工程重点实验室，乌鲁木齐 830046）

摘要 近年来，卵泡刺激素（Follicle-stimulating hormone，FSH）在骨质疏松中的作用得到了证实。卵泡刺激素受体（FSH receptor，FSHR）在成熟的人破骨细胞及破骨细胞前体即单核细胞表面表达，成为阻断 FSH 作用的潜在靶点。本实验制备高滴度的兔抗人 FSHR 多克隆抗体，采用双侧去卵巢手术方法建立 SD （Sprague-Dawley）大鼠骨质疏松症动物模型，观察抗 FSHR 抗体对大鼠实验骨质疏松症的治疗效果。结果显示，卵巢摘除（ovariectomized，OVX）大鼠经抗 FSHR 多抗和亮丙瑞林（leuprorelin ，LE）治疗两周后，与 PBS 对照组相比，血清 FSH 和黄体酮（luteinizing Hormone，LH）水平显著降低（$P<0.05$），而雌二醇（estrogen，E2）水平有一定升高，但结果不显著（$P>0.05$）。另外，骨组织化学染色显示多抗和 LE 治疗组大鼠骨小梁数目增加，断裂现象较少。这些结果初步表明，采用抗 FSHR 抗体对 SD 大鼠骨质疏松症具有一定的治疗作用。

关键词 骨质疏松症；SD大鼠；抗FSHR多克隆抗体；卵泡刺激素受体；亮丙瑞林

中图分类号 R392.1

随着老龄化社会的到来，骨质疏松症已成为威胁人类健康的重要疾病之一。成骨细胞与破骨细胞组成骨重建单位，在健康的成人中破骨与成骨过程保持相对平衡，这有赖于两种细胞彼此之间有良好的互相调节。当免疫功能紊乱时通过各种途径加速骨吸收，延缓骨生长，导致骨质疏松[1]。当前绝经后骨质疏松已成为全球关注的健康问题之一，妇女进入更年期由于雌激素缺乏会导致骨吸收速度快于骨生成，促使骨的大量流失而形成骨质疏松[2]。

卵泡刺激素（Follicle Stimulating Hormone，FSH）是垂体分泌的一种糖蛋白激素，具有促进和维持性腺正常发育，在生殖中发挥重要功能。近期，文献报道破骨细胞的形成受到 FSH 的刺激而影响其骨转换，FSH 刺激破骨细胞的形成通过激活 Gi2a-偶联的 FSHR 实现[3]。绝经期妇女的血清 FSH 水平变化与骨密度（BMD）或骨吸收标志物相关，甚至在围绝经期雌二醇下降[4]。Wang Jie[5]等调

收稿日期: 2016-12-27 修回日期: 2017-01-17
* 国家自然科学基金资助项目 (81260333)
**通讯作者，电子邮箱: jwli67@sina.com

查了248 例骨代谢正常的绝经后女性，发现随着年龄的增长，血清FSH 与LH 水平逐渐增加，在 60 岁左右达到最高值，60 岁以后慢慢下降，血清 E2 水平和前臂骨密度逐渐降低，实验研究表明 FSH 通过刺激破骨细胞的分化是导致绝经后骨质疏松的主要原因。已在动物体内证实，FSH 具有刺激破骨细胞的形成，促进骨的重吸收功能和促进破骨细胞存活的功能[6]。且 Sun 等人发现 FSH 可以直接作用于破骨细胞和破骨细胞前体上的 FSHR，从而增强破骨细胞的形成和功能[7]。因此，阻断 FSH 或其与受体 FSHR 的结合有可能起到保护性腺机能减退的骨丢失[8]。

最近，Zhu[3]等报道了抗 FSH 的抗体可以抑制实验动物的骨质疏松，实验发现 FSH 抗体使骨形成和骨吸收解偶联，有效的刺激成骨细胞的形成。另外，Liu[6]采用 FSH 抑制剂亮丙瑞林也能到达到抑制实验动物的骨质疏松的作用。这些实验表明阻断 FSH 通路可以起到对骨质疏松的治疗作用。FSH 的作用是通过结合其受体 FSHR 实现的。FSHR 表达于人间叶干细胞（mesenchymal stem cells），也表达于成骨细胞和单核细胞表面，其表达水平与骨质疏松之间的关系还不清楚，但在牙骨质中，FSHR 的表达数量与骨质流失成正相关。目前还没有报道阻断 FSHR 对骨质疏松的影响。

本研究通过建立 SD 大鼠骨质疏松症模型，利用制备的抗 FSHR 多克隆抗体进行治疗，分析主要雌激素 FSH、LH 及 E2 的变化，对大鼠股骨颈骨密度值（BMD）测定，以及组织病理学观察等以验证抗 FSHR 多克隆抗体对骨质疏松实验动物的治疗效果。

1. 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料

新西兰兔，两只，雌性，2 kg / 只，购于新疆医科大学实验动物中心; 30 只 10 周龄左右雌性 SPF 级 Sprague-Dawley（SD）大鼠，体重（200~250g），购于新疆医科大学实验动物中心。实验动物许可证号：SCXK（新）2016-0003。实验随机分为 2 组，去卵巢骨质疏松模型组 21 只和假手术对照组 9 只。每笼 5 只，于室温条件在 24℃左右饲养，清洁环境下饲养，自由进食水，饲料及饮用水相

同；Protein A/G-Plus Beads 抗体纯化柱购于北京全式金；Protein A 亲和介质购于 GE 公司

1.1.2 实验试剂

蛋白 marker 及蛋白预染 marker 购自 Thermo 公司；Ni SepharoseTM6 Fast Flow 购于 GE Healthcare 公司；Bradford 法蛋白定量试剂盒购自北京百泰克生物技术有限公司；完全弗式佐剂及不完全弗式佐剂购于 Sigma 公司；Goat Anti-rabbit-IgG H&L（HRP）购于康为世纪公司；IPTG 购于 Genview 公司，SD 大鼠实验所用试剂均购自新疆医科大学实验动物中心；其它常用试剂均为国产分析纯。

1.1.3 实验仪器

化学发光仪（美国，DXi800 型号）；双能 X 线骨密度测量仪（美国，LE XX09）；生理生化检测仪（美国，DXi800 型号）；台式高速离心机（力康发展有限公司），Lynx 6000 centrifuge（Thermo Fisher），洁净工作台（BoXun）等。

1.2 实验方法

1.2.1 抗 FSHR 多克隆抗体的制备及鉴定

表达纯化实验室前期构建的 $FSHR_{234}$ 蛋白[9]，Bradford 法测定蛋白浓度为 0.5 mg/ml，利用纯化的 $FSHR_{234}$ 蛋白免疫新西兰兔，初次免疫抗原为 200 μg，每隔两周加强免疫，共免疫七次。在第七次加强免疫两周后，静脉采血并分离得到上层血清。采用 Protein A 纯化血清。间接 ELISA 法检测抗 FSHR 多克隆抗体的最低结合浓度，一抗为纯化的未免血清和纯化的免疫后血清，二抗为 Goat Anti-rabbit-IgG H&L（HRP）。TMB 显色，Prism 5.0 作图，并计算与抗原反应的最适多抗浓度。Western Blot 检测抗 FSHR 多克隆抗体结合特异性，$FSHR_{234}$ 按上样量为 16 μg，一抗为抗 FSHR 多克隆抗体 IgG 稀释至 4μg/mL，4 ℃孵育 12 h。二抗为 Goat Anti-rabbit-IgG H&L（HRP）1:5000，37 ℃孵育 1.5 h ，DAB 显色。

1.2.2 SD 大鼠骨质疏松模型的建立

大鼠腹腔注射戊巴比妥钠 3%，按 40 mg/Kg 麻醉，大鼠仰卧固定板，腹部术部剃毛消毒。正中部位切开腹部皮肤，分离腹肌腹膜打开腹腔。寻找卵巢并分离结扎输卵管并将卵巢完全切除（这一过程称为“去势”），缝合切口内皮及外皮

层，术后肌肉注射青霉素，80 万 U/kg。假手术对照组麻醉方法、手术操作同手术组，只是开腹后不摘除卵巢，只在卵巢附近触摸并按以上相同路径操作。两组大鼠饲养条件一致。

1.2.3 抗 FSHR 多克隆抗体对实验大鼠骨质疏松症的治疗

SD 大鼠随机分为 4 组，按以下剂量尾静脉注射治疗。A、假手术（SHAM）组：6 只，不加任何药物；B、OVX+pAb_{FSHR}：5 只，2 mg/kg ；C、OVX+LE：5 只，1.6 mg/kg；D、OVX：5 只，PBS 按 200 μl/只。每周治疗 2 次，共治疗 12 次即 6 周。

1.2.4 大鼠血清生化检测及 E2、FSH、LH 水平测定

分离得到血清样品，-20℃冷藏并于 48 小时内送于新疆维吾尔自治区区医院质检科，利用全自动化学发光仪测定血生化指标血钙（S-Ca）、血磷（S-P）含量检测以及雌激素水平雌二醇（E2）、促黄体生成素（LH）和促卵泡刺激素（FSH）。

1.2.5 大鼠骨密度（BMD）测定

乙醚麻醉处死大鼠，割取后腿，剔除毛皮层，送去新疆医科大学附属中医医院，利用双能 X 线骨密度测量仪测量股骨颈骨密度（BMD）（g/cm2）[10-12]。

1.2.6 免疫组化检测 SD 大鼠骨组织病理学

取右腿股骨，剔除骨组织周围的软组织，用 4 %多聚甲醛固定液室温固定 48 h。将已固定的骨组织按 1:30 的比例加入 EDTA 脱钙液，每隔 48 h 更换一次，并控制温度在 25 ℃，至完全脱钙大约两周可以发现骨组织变软，用大头针轻轻刺入而感觉不到阻力为宜。脱钙后骨组织用蒸馏水冲洗，进行石蜡包埋，切片，脱蜡后，苏木精-伊红（HE）染色观察骨组织病理学变化。

1.2.7 数据处理及分析

采用 prism5.0 作图，数据经过统计学处理，采用方差分析和 t 检验方法进行显著性检验。

2. 结果

2.1 抗 FSHR 多克隆抗体的制备及鉴定

原核表达获得 $FSHR_{234}$ 抗原[9]，SDS-PAGE 检测结果如图 1A 所示，将纯化得到的 $FSHR_{234}$ 蛋白免疫新西兰兔，第七次加强免疫两周后分离得到上层血清用于

纯化。采用 Protein A 纯化血清总 IgG(图 1B)。抗原 $FSHR_{234}$ 在确定最适结合浓度后固定其为 1μg/mL，包被 96 孔 ELISA 板，将免疫血清和未免血清稀释固定至相同浓度 1mg/mL，再将稀释后蛋白按倍比稀释为不同浓度即 1:250、1:500、1:1000、1:2000、1:4000、1:8000、1:16000、1:24000 等 8 个比例作为一抗，对应浓度分别为 4 μg/mL、2 μg/mL、1 μg/mL、0.5 μg/mL、0.25 μg/mL、0.125 μg/mL、0.0625 μg/mL、0.0938 μg/mL，二抗为 Goat Anti-rabbit-IgG H&L（HRP），从 ELISA 结果（图 1D）可以得出，在稀释比例为 1:16000，浓度为 0.0625 μg/mL 的时候，免疫后血清纯蛋白 OD 值/免疫前血清纯蛋白 OD 值大于 2.1，即为多抗最低反应浓度。

Western Blot 检测抗 FSHR 多克隆抗体（图 1C），结果显示在多克隆抗体浓度为 4 μg/mL 时，可以与抗原 FSHR 特异性结合，而与无关蛋白没有结合。

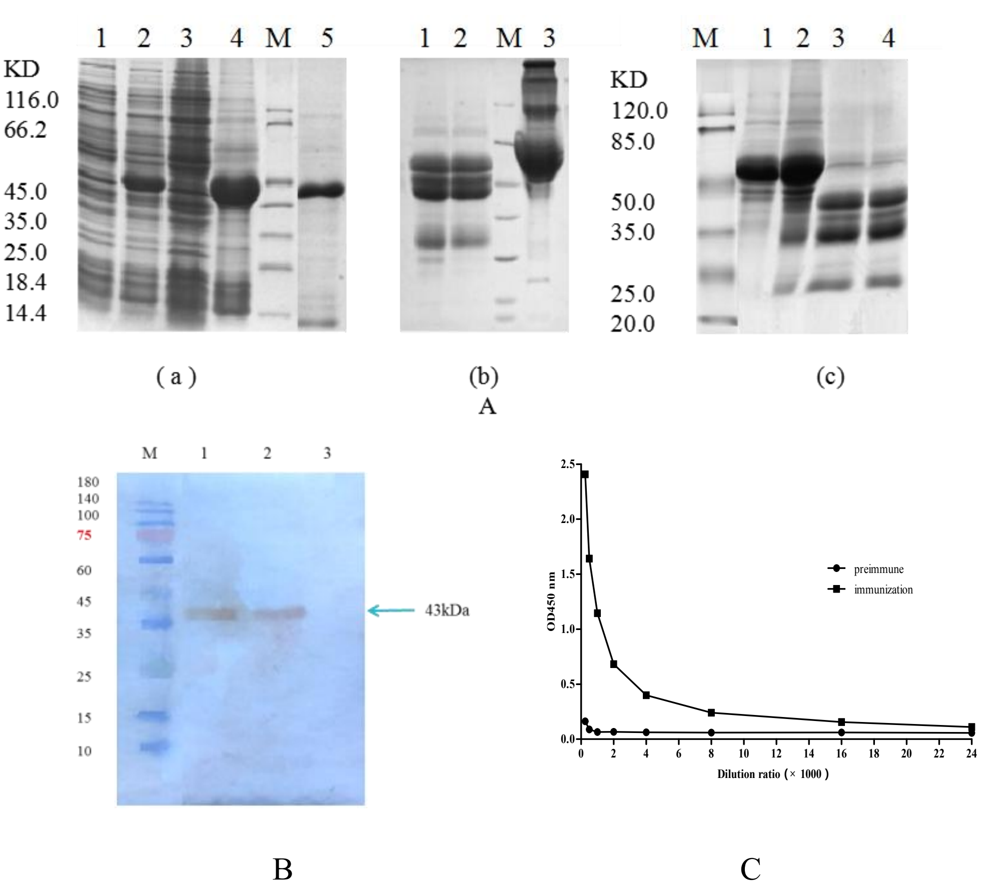


图 1　抗 FSHR 多克隆抗体的制备及纯化

Fig.1　Preparation and identification of anti-FSHR polyclonal antibody.

A. Expression and purification of FSHR234 antigen. a:1.uninduced BL21-pET-30a-*fshr*234; 2. induced BL21-pET-30a-*fshr*234; 3. supernatant protein of induced bacterial lysate; 4. precipitation of induced bacterial lysate; 5. purified protein of His-FSHR234. b: purification of rabbit preimmune serum. 1-2, purified protein of under reduced; 3, purified protein of under non-reduced. c: purification of rabbit immune serum. 1-2: Elution using binding buffer; 3-4: purified protein of under reduced. B. Detecting the binding of FSHR polyclonal antibody with recombinant FSHR by Western Blot. Samples in lanes *1-2* contained FSHR234 protein 16 μg while lane 3 contained irrelevant protein CD133; C: The titer of anti-FSHR polyclonal binding with FSHR assayed by ELISA（>1：40000）. The optimal binding concentration of anti-FSHR polyclonal antibody is 0.0625 μg/mL.

2.2 OVX 大鼠血清 E2、 FSH、LH 水平的测定

SD 大鼠分组情况及去势实验如实验部分所示，每周大鼠称体重。可以看出 OVX 组及 SHAM 组大鼠体重逐渐增加，但两组增长并无统计学意义（P>0.05）（图 2A）。对 E2、FSH、LH、水平进行测定，可以看出，OVX 组 E2 水平在去势 2 周后急速下降（图 2B），在第 2 周- 5 周时内，与 SHAM 组相比，OVX 组 E2 水平降低具有极显著差异（P＜0.01），在 SHAM 组中 E2 水平保持不变。同时在 OVX 组中 FSH 和 LH 在 2 到 5 周内有逐渐增加的趋势，但增加不显著（P>0.05）（图 2C、2D）。以上实验结果基本符合大鼠骨质疏松模型的激素变化特征。

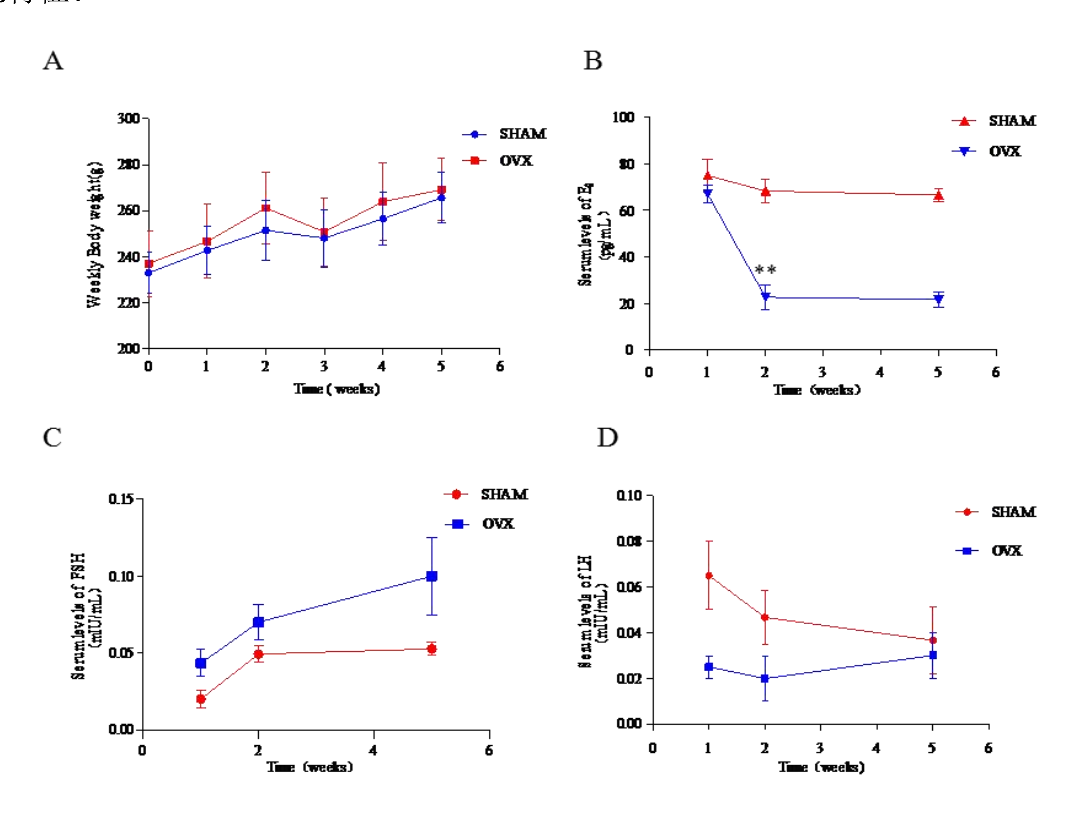


图 2 去势大鼠血清激素水平变化

Fig.2 The serum hormone levels change in ovariectomized rats.

A: The body weight of rats in OVX group and SHAM group increased gradually, but had no statistical significance (P > 0.05); B-D: The E2, LH and FSH levels were determined by automatic chemiluminescence analyzer. E2 levels in OVX group fell sharply after 2 weeks (**P < 0.01) (B) and FSH levels increased no significant compared with the SHAM group(P > 0.05) (C); LH levels changed no significantly(p>0.05) (D).

2.3 大鼠血清生化检测

对大鼠血钙（S-Ca）、血磷（S-P）含量进行测定，实验结果见表 1，可以看出，大鼠建模 6 周后，与 SHAM 组相比，OVX 组大鼠血清钙（S-Ca）含量均

有下降，血清磷（S-P）含量显示升高。在临床中机体部分骨流失时血清钙含量会有降低，测定结果符合骨质疏松临床现象。但是相比之下，两组差异并不显著（P>0.05）。

表 1 SD 大鼠血清中钙和磷含量的变化

Table 1 Changes of calcium and phosphorus in serum of SD rats（$\overline{X} \pm S$）

组别	n	S-Ca（mmol·L^{-1}）	S-P（mmol·L^{-1}）
OVX 组	3	2.0967±0.159	1.6533±0.208
SHAM 组	3	2.3567±0.105	1.5733±0.124

Note：Compared with the SHAM group, P > 0.05.

After 6 weeks, compared with the SHAM group, group OVX rats serum calcium (S-Ca) content were decreased, content of serum phosphorus (S-P) increase, there is no significance difference between the two groups (P > 0.05)

2.4 大鼠骨密度（BMD）测定

在去势第 8 周，进行大鼠左股骨颈 BMD 测定，两组相比较， OVX 组明显低于 SHAM 组 P＜0.05（表 2）。

表 2 去势 SD 大鼠骨密度测定结果

Table 2 Determination of bone mineral density in ovariectomized SD rats（$\overline{X} \pm S$）

组别	n	骨密度（g/cm^2）
OVX 组	3	0.073±0.0050*
SHAM 组	3	0.095±0.0098

Note：OVX group compared with the SHAM group, *P＜0.05.

2.5 抗 FSHR 多克隆抗体治疗对 OVX 大鼠血清 E2、 FSH、LH 水平的影响

大鼠体重在抗 FSHR 多克隆抗体和 LE 治疗后，有逐渐增加的趋势，但每组间体重增加的差异不明显（P>0.05）（图 3A）。

抗 FSHR 多抗或 LE 注射 OVX 大鼠治疗六周时，E2 水平明显降低达到 10pg/mL 左右，显著低于 SHAM 组（P<0.05），但各处理组间 E2 水平没有显著差异（p>0.05）（图 3B）。同时，各处理组 FSH 水平与 PBS 对照组相比显著降低（P<0.05）。另外，在治疗第六天时，处理组 LH 水平与 PBS 对照组相比也显著降低（P<0.05）（图 3D）。表明 FSHR 多抗和 LE 对去卵巢大鼠 FSH 和 LH 水平的增高有明显抑制作用。

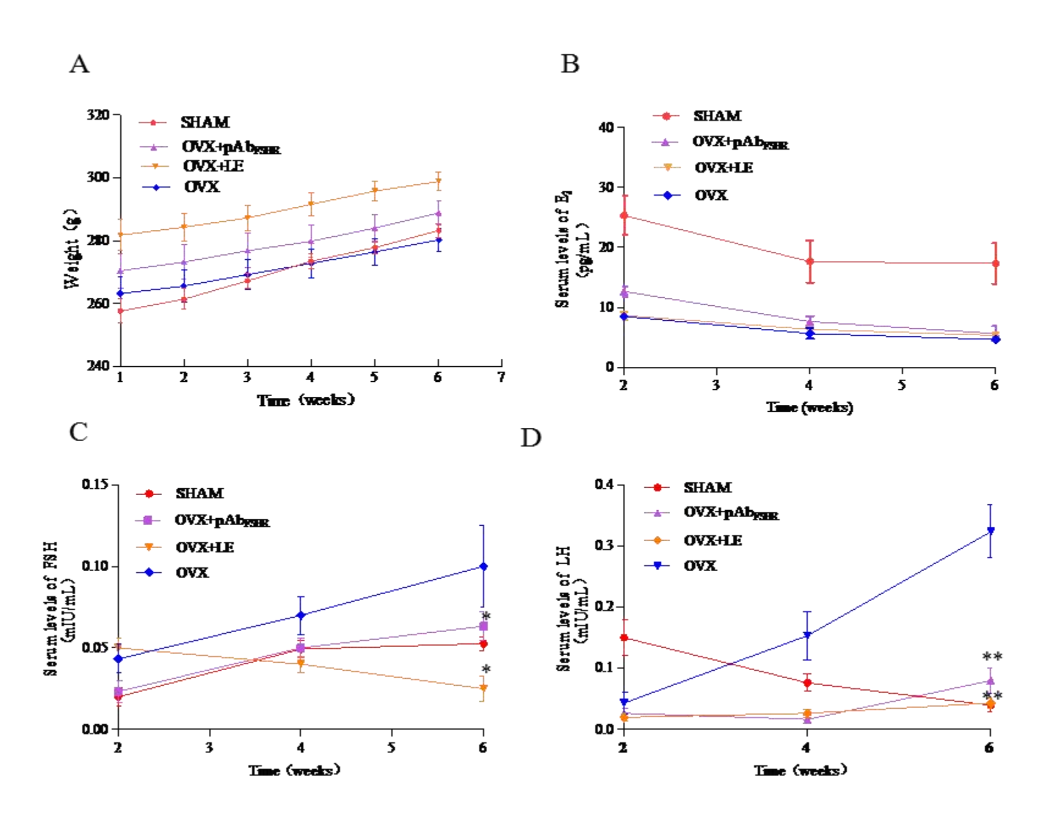


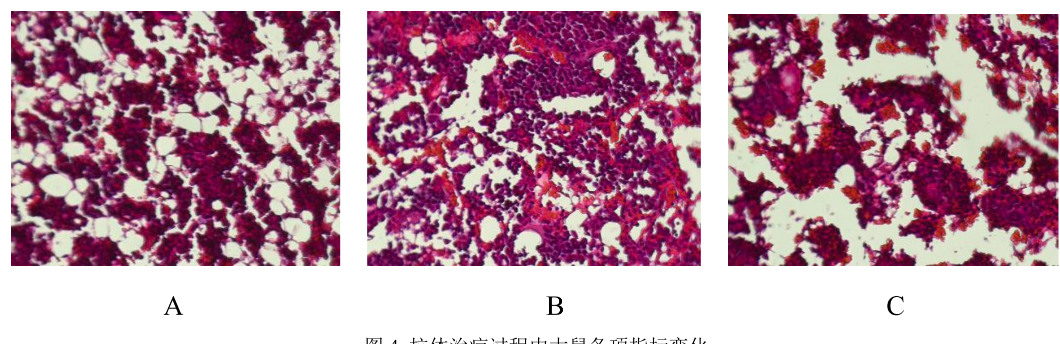
图 3　去势大鼠治疗前后血清激素水平的变化

Fig.3　The serum hormone level in ovariectomized rats before and after treament

A: The body weight of rats. B: The E2 levels in pAb_{FSHR} and LE treated OVX groups increased but not reached significant compared with PBS injected OVX (P >0.05). C: The FSH levels decreased significantly (*P < 0.05) after pAb_{FSHR} and LE treatment from the fourth to sixth weeks in OVX group compared with PBS injected OVX rats. （D）The LH levels decreased significantly (**P < 0.01) after pAbFSHR and LE treatment at the sixth weeks in OVX group compared with PBS injected OVX rats.

2.6 免疫组化分析

OVX 组右股骨病理组织学检查显示骨小梁变得细小，而且数量减少，存在断裂现象，髓腔间隙较宽（图 4C）；施加 LE 组，显著抑制了 FSH 水平的增加（图 4B），由于 FSH 水平升高会导致骨质疏松，组织学观察到抑制 FSH 水平后骨髓腔间隙变小，骨小梁相对较多，与 OVX 组是拮抗关系，针对疾病 E 组骨质疏松具有好转趋势。利用多克隆抗体治疗组，与 OVX 组比较发现，多克隆抗体治疗组骨小梁数量增加较多，断裂现象较少，说明治疗有一定效果（图 4A）。



A　　B　　C

图 4　抗体治疗过程中大鼠各项指标变化

Fig.4 Changes of various indexes in the process of antibody treatment
A.OVX+ pAb_{FSHR}；B. OVX+LE； C. OVX，（HE×20）

3. 讨论

骨质疏松的危害已引起公众关注，不管是临床还是研究领域，力求寻找针对骨质疏松药效更好、靶点更佳的治疗药物势在必得，抗体疗法也给医学领域癌症的治疗等提供新的思路与方法。对于绝经后骨质疏松的治疗，骨合成代谢中骨的重建和防止骨的流失在治疗骨质疏松症方面具有潜在的利用价值，并成为长期的治疗目标[13]。最近研究表明 FSH 可以直接导致骨质疏松，并且利用尾静脉注射抗 FSH 抗体的治疗方法，可以改善和防止骨的流失，并达到治疗绝经后骨质疏松的目的[7-8,14-16]。这些研究提示 FSH－FSHR 可以作为骨质疏松治疗的潜在的靶点。

本研究中，我们探讨靶向 FSH 受体的抗体对骨质疏松的治疗效果。采用大鼠卵巢切除建立骨质疏松动物模型。建模 6 周后，与 SHAM 组相比 OVX 组大鼠血清钙（S-Ca）含量下降，血清磷（S-P）含量升高，但是相比之下，两组间差异并不显著 P>0.05。但是存在变化趋势说明大鼠去势后 Ca 含量是降低的，说明骨质在流失。BMD 能反映 OVX 组骨量的丢失，去卵巢 2 周后大鼠 E2 水平显著下降，左侧股骨颈 BMD 明显降低，与临床已有文献报道 FSH 可以直接导致骨质疏松症特征相符，以上说明建立大鼠骨质疏松症动物模型成立[12,17-18]。通过注射给药治疗发现，随着治疗时间的延长，大鼠生长体重增加，OVX 组增长较慢，OVX+pAb_{FSHR} 组有一定的增长。OVX+LE 对体重的增加影响较大，可能原因是，LE 是抑制了 FSH 激素的增加，而随着注射 LE 的时间加长，FSH 水平会降低，会影响脂肪组织增加，从而使得体重增加较快[19]。而在程敏等作者利用女贞子灌胃给药治疗大鼠骨质疏松过程中，每周给药 6 天，在治疗 26 周后才显示体重的差异较显著。而本实验中可能原因是治疗时间不够长才使大鼠体重增加不够明显。大鼠机体内 LH 与 FSH 是相互协同作用，当去势后 E2 水平显著降低时，LH 与 FSH 相应的增加以维持雌激素的平衡。实验中，多克隆抗体治疗后抑制了 FSH 水平的增加，对骨质疏松症具有治疗作用。可能原因是本实验中制备的多克隆抗体与 FSHR 特异结合，从而阻断了 FSH 与其受体 FSHR 的结合，体内环境周围产生大量 FSH，由于负反馈调节作用会反过来刺激垂体减少 FSH 的释放，从而抑制 FSH 水平的增加。阳性对照采用 LE，而 LE 本身具有抑制垂体生成和释放

促性腺激素的作用，施加 LE 后限制了垂体释放 FSH 使得 FSH 水平显著降低（P<0.05）。组织病理学观察结果表明，去卵巢后，由于雌激素的减少，对破骨细胞抑制减弱，骨吸收大于骨形成，骨骼呈高度转换状态，骨量处于不平衡状态，OVX 组大鼠骨丢失明显增加，而抗 FSHR 抗体治疗后可以抑制骨量的流失。

总之，本研究成功建立大鼠骨质疏松症动物模型，利用制备的高滴度的兔抗人 FSHR 多克隆抗体进行治疗，并证实其可以显著降低血清 FSH 和 LH 的水平，同时增加大鼠骨小梁数目，减少断裂现象，说明兔抗人 FSHR 多克隆抗体对 SD 大鼠骨质疏松症具有一定的治疗作用。研究结果为今后进一步开发基于该靶点的临床应用提供了有价值的实验参考。

参考文献

[1] Kim J H, Kim E Y, Lee B, et al. The effects of Lycii Radicis Cortex on RANKL-induced osteoclast differentiation and activation in RAW 264.7 cells. International Journal of Molecular Medicine, 2016,37(3):649-658.

[2] 潘德, 郝秋芳, 王玮,等. 绝经老年妇女骨质疏松调查及影响因素分析. 中国老年学杂志, 1994(6):352-354.

Pan D, Hao QF, Wang W,et al. Older women menopause osteoporosis research and influence factors analysis. Chinese journal of gerontology,1994(6):352-354.

[3] Zhu L L, Blair H, Cao J,et al. Blocking antibody to the β-subunit of FSH prevents bone loss by inhibiting bone resorption and stimulating bone synthesis. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2012, 109(36): 14574-14579.

[4] Cannon J G, Cortez-Cooper M, Meaders E, et al. Follicle-stimulating hormone, interleukin-1, and bone density in adult women. American Journal of Physiology-Regulatory,ntegrative and Comparative Physiology, 2010, 298(3): R790-R798.

[5] Wang J, Zhang W, Yu C, et al. Follicle-Stimulating Hormone Increases the Risk of Postmenopausal Osteoporosis by Stimulating Osteoclast Differentiation. PloS one, 2015, 10(8): e0134986.

[6] Liu S, Cheng Y, Xu W, et al. Protective effects of follicle-stimulating hormone inhibitor on alveolar bone loss resulting from experimental periapical lesions in ovariectomized rats. Journal of endodontics, 2010, 36(4): 658-663.

[7] Sun L, Peng Y, Sharrow A C, et al. FSH directly regulates bone mass. Cell, 2006, 125(2): 247-260.

[8] Sun L, Zhang Z, Zhu L L, et al. Further evidence for direct pro-resorptive actions of FSH.Biochemical and biophysical research communications, 2010, 394(1): 6-11.

[9] 夏雪琴, 木亚沙尔·买买提拉洪, 翟田甜,等. 抗卵泡刺激素受体纳米抗体的制备及鉴定. 细胞与分子免疫学杂志, 2013, 29(8):829-833.

Xia XQ, Mu YS, Zhai TT,et al. Preparation and identification of anti-follicle-stimulating hormone receptor nanobodies. Chin J Cell Mol Immunol,2013,29(8):829-833.

[10] 卢勇, 孟庆才, 方锐,等. SD 大鼠骨性关节炎合并骨质疏松症模型的建立. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(46):9092-9096.

Lu Y, Meng QC, Fang R,et al. Establishment of SD rat models of osteoarthritis and osteoporosis. Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research,2009,13(46):9092-9096.
[11] 田茂友，李洪洋.去卵巢大鼠骨质疏松模型研究. 现代预防医学，2007, 34(12):2239-2241.
TIAN MY, LI HY. Experimental study on the model of osteoporosis in ovariectomized rats[J].Modern Preventive Medicine,2007,34(12):2239-2241.
[12] 李旭鸿，侯曼，仰红慧. 骨密度的测定方法及影响因素.天津体育学院学报, 2005, 20(3):62-65.
Li HX, Hou M, Yang HH. The measurement methods and influence factors of bone density. Journal of TjIPE,2005,20(3):62-65.
[13] Xiaodong L, Ominsky M S, Warmington K S, et al. Sclerostin antibody treatment increases bone formation, bone mass, and bone strength in a rat model of postmenopausal osteoporosis. Journal of Bone & Mineral Research the Official Journal of the American Society for Bone &Mineral Research, 2009, 24(4):578-88.
[14] Durlej M, Knapczyk-Stwora K, Duda M, et al. The Expression of FSH Receptor (FSHR) in the Neonatal Porcine Ovary and its Regulation by Flutamide. Reproduction in Domestic Animals, 2011, 46(3):377-84.
[15] Haberman S, Race G J. Application of immunofluorescence to study of human tumors by rabbit antibody production to nucleoprotein of human malignant tissues. Texas medicine, 1968, 64(5):45.
[16] Heukers R, en Henegouwen P M P B, Oliveira S. Nanobody－photosensitizer conjugates for targeted photodynamic therapy. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 2014,10(7): 1441-1451.
[17] Kalu D N. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. Bone & Mineral, 1992,15(3):175-91.
[18] Liu S P, Liao E Y, Han wen W U, et al. Comprehensive assessment of the ovariectomized rat model of postmenopausal osteoporosis. Bulletin of Hunan Medical University, 2001, 26(2):111-4.
[19] Pujol J P, Chadjichristos C, Legendre F, et al. Interleukin-1 and Transforming Growth Factor-ß 1 as Crucial Factors in Osteoarthritic Cartilage Metabolism. Connective tissue research, 2008,49(3-4): 293-297.

Inhibition of Osteoporosis in Ovariectomized Rats Using Follicle-stimulating Hormone Receptor Specific Polyclonal Antibody*

QIN Rui-ping, LI Ling-xia, MA Xiao-ling, XI Ou-yan, ZHAO Ting, QIU Lingling, LI Jiang-wei**（*Xinjiang Key Laboratory of Biological Resources and Genetic Engineering, College of Life Science and Technology, Xinjiang University, 830046, Urumqi ,China*）

Abstract： There are strong evidences to support the idea that follicle-stimulating hormone (FSH) plays an important role in regulation of bone mass. Owing to its limited expression to gonadal tissues and osteoclasts and its precursor monocytes, FSH receptor may be a good target for FSH blocking therapy. In this study, high titers of polyclonal rabbit anti-human FSHR antibody (pAb_{FSHR}) was raised and prepared. The bilateral ovariectomized (OVX) Sprague-Dawley (SD) rats were used as the osteoporosis model for evaluating the effects of pAb_{FSHR} and FSH inhibitor

leuprorelin(LE) on the bone loss. The results showed after treatment with pAb_{FSHR} and LE separately, the FSH and luteinizing hormone(LH) levels in OVX groups decreased significantly ($p<0.05$) compared with PBS treated OVX rats. No significant differences of estrogen (E2) levels were detected between treatment and PBS injected OVX rats ($P > 0.05$). In addition, the number of trabecular bone increased after pAb_{FSHR} treatment in OVX groups in the shin bone histologic analysis. The results suggested targeting against FSHR may work on the treatment of osteoporosis.

Key words: Osteoporosis; SD rats; anti-FSHR polyclonal antibody; follicle-stimulating hormone receptor; leuprorelin